



小麦萌发前后淀粉 酶活性的比较

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐



实验目的及要求

1. 学习分光光度法测定酶活力的原理与方法；
2. 了解小麦萌发前后淀粉酶活力的变化。

实验的基本原理

淀粉酶是水解淀粉的糖苷键的一类酶的总称。实验证明，在某些植物如小麦、大麦的休眠种子中只含有 β -淀粉酶， α -淀粉酶是在发芽过程中形成的，所以在禾谷类萌发的种子和幼苗中，这两类淀粉酶都存在。其活性随萌发时间的延长而增高。

本实验以淀粉酶催化淀粉生成麦芽糖的速度来测定酶的活力。麦芽糖是还原性糖，能使3, 5-二硝基水杨酸还原成棕色的3-氨基5-硝基水杨酸，后者在500 nm处有最大吸光度，而进行定量测定。

主要仪器设备及试剂

可见分光光度计

离心机

恒温水浴

研钵

小麦种子

标准麦芽糖

0.2%淀粉

1%氯化钠溶液

0.02 mol/L 磷酸缓冲液

石英沙

3, 5--二硝基水杨酸溶液

实验步骤

1. 麦芽糖标准曲线制作

取7支具塞刻度试管，编号，按表 1 加入试剂：

表 1 制作麦芽糖标准曲线配方表

试剂	管 号						
	1	2	3	4	5	6	7
麦芽糖标准液 (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水 (ml)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
3,5-二硝基水 杨酸	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

充分摇匀，置于沸水浴中煮沸 5 min 。取出后流水冷却，加蒸馏水定容至 10 m L 。以 1 号管作为空白调零点，在 540 nm 波长下比色测定。以麦芽糖含量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

2、萌发小麦种子

浸泡小麦种子24h，入25° C恒温箱或在室温下发芽。

3、提取小麦萌发前后的酶液

(1) 幼苗酶的提取：取萌发的幼苗10株，入研钵加石英砂0.2 g，1 % NaCl 3 ml，研磨成匀浆，0-4 ° C下放置20 min。离心，3000 r/min 3 min。测定上清酶液的总体积。

(2) 种子酶的提取：取干燥种子10粒作对照，操作方法同上。

4、二硝基水杨酸法测定酶活力

量取待测酶液1 ml，pH6.9的0.02mol/L磷酸缓冲液稀释10倍，作为酶活力测定物。

取6根试管按下表加各物质：

试剂	试管编号		
	1、2 (种子酶稀释液)	3、4 (幼苗酶稀释液)	5、6 (空白管)
V (0.2% 淀粉溶液) /ml	1	1	1
V(蒸馏水)/ml	--	--	0.5
V(稀释酶液)/ml	0.5	0.5	--

混匀各管，40 ° C恒温水浴，3 min，加入1 % 3, 5-二硝基水杨酸溶液 2 ml。入沸水浴，准确加热5 min，迅速冷却至室温，加水稀释至20 ml，混匀。

测定各管的A540nm值。

5、计算酶活力单位

$$\text{总酶活力单位} = (C_{\text{酶}} - C_0) \times n \times V_{\text{酶}}$$

式中： $C_{\text{酶}}$ 为种子酶或幼苗酶分解淀粉产生的麦芽糖的浓度（mg/ml）；

C_0 为表2中空白管的麦芽糖浓度；

n 为酶溶液稀释的倍数；

$V_{\text{酶}}$ 为提取酶液的总体积（ml）。

设在40 ° C、pH 6.9的条件下，3 min内水解淀粉释放1 mg麦芽糖所需要的酶量为1个活力单位（U）。

思考题

- 1、为什么提取酶液的过程应该在0-4 °C下进行？测定淀粉酶活性时为什么要在40 °C条件下水解淀粉？
- 2、小麦萌发过程中淀粉酶活性升高的原因和意义是什么？